

AKE inhibiitorite toime erütrotsüütide rauast tingitud deformatsiooni muutustele

Külli Teder, Kersti Zilmer, Jaak Kals, Mihkel Zilmer – TÜ biokeemia instituut

kaptopriil, ramiprilaat, fosinopriilaat, raud, erütrotsüüdid

Töös uuriti, kas AKE inhibiitorid kaptopriil, ramipriil ja fosinopriil on võimelised terapeutilistes kontsentratsioonides *in vitro* ära hoidma raud-initsieeritud erütrotsüütide deformatsiooni vähenemist. Kuna ramipriil ja fosinopriil muudetakse organismis aktiivvormideks, uuriti nende puhul aktiivvorme ehk ramiprilaati ja fosinoprilaati. Erütrotsüütide deformeeritavust hinnati kromatograafilise migratsiooni kaudu, määrates seda enne ja pärast ravimiga eeltötlust. Leiti, et raua poolt põhjustatud erütrotsüütide deformatsiooni vähenemist takistasid kõik uuritavad ained ja seda juba terapeutilistes kontsentratsioonides. Erinevate AKE inhibiitorite toime efektiivsus oli samal ajal sõltuv rauakontsentratsioonist.

Kõrgenenud arteriaalne vererõhk mõjutab paljude kardiovaskulaarsete haiguste kulgu. Sageli kasutatakse vererõhu langetamiseks angiotensiini konverteeriva ensüümi (AKE) inhibiitoreid: kaptopriili, fosinopriili, ramipriili, enalapriili, lisinopriili jt (1). Uuringud, mis tooksid esile uusi aspekte seda tüüpi AKE inhibiitorite kohta ja seda võrdlevalt, on hüpertensiooni ravis väga vajalikud, sest ravi on pikaajaline, tihti elukestev. AKE inhibiitorite ja mikrotsirkulatsiooni seosed on vererõhu seisukohalt võetuna väga olulised (2). Seega peaks teadma hüpertooniaravimite mõju erütrotsüütide ja teiste vererakkude reoloogilistele parameetritele. Eelnevalt lähtudes uurisime erütrotsüütide deformeeritavust, mis tegelikult otsustabki nende võime läbida väga väikese läbimõõduga kapillaare piisava kiirusega. Testisime seda raua juuresolekul, sest kahevalentne raud on üks võimsamatest pro-oksüdantidest, rauda vabastavaid sündmusi esineb inimorganismis tihti ning samas on ka rauapreparaatide kasutamine väga sage. On teada, et raud võib kestva oksüdatiivse stressi tingimustes oma sidujatest, ka hemoglobiinist ja ferritiinist, vabaneda. Vabad rauaioonid põhjustavad erütrotsüütide membraanilipiidide peroksüdatsiooni ning kahjustavad erütrotsüütide membraani, mistõttu häirub erütrotsüütide elastsus ja deformeeritavus ning nad võivad väikestes veresoontes peetuda, aga ka verevoolu tõttu puruneda (1, 3, 4).

Uurimuse eesmärgiks oli uurida, kas

- AKE inhibiitoritel endil võiks olla terapeutilises kontsentratsioonis erütrotsüütide deformeeritavust häiriv toime;
- raud mõjutab erütrotsüütide deformeeritavust ning kas AKE inhibiitorid võiksid omada kaitsetoimet raua mõju suhtes.

Uurimismaterjal ja -meetodid

Töös uuriti kolme AKE inhibiitorit: kaptopriili, ramipriili ja fosinopriili. Katsed teostati organismis toimet avaldavate ravimivormidega, st kaptopriili, ramiprilaadi ning fosinoprilaadiga (vastavalt ramipriili ja fosinopriili aktiivsed metaboliidid). Kaptopriil saadi Ravimiametist, ramiprilaat firmast Aventis Pharma (Hoechst AG), fosinoprilaat firmast Bristol-Myers Squibb. Veeniveri võeti vabatahtlikelt tervetelt doonoritelt hepariiniga Vacutainer-katsutitesse. Töös kasutati füsioloogilises lahuses lahustatud ravimeid järgmises lõppkontsentratsioonis: kaptopriil 5 µM, ramiprilaat 7,5 ng/ml, 15 ng/ml ja 30 ng/ml ning fosinoprilaat 125 ng/ml ja 175 ng/ml. Need valiti kirjanduse andmetel. Kaptopriili suukaudne annus on 50...100 mg päevas, mis annab plasma sisalduseks 3–8 µM (5, 6). Fosinopriili ühekordne suukaudne annus on 10 mg, millest moodustub plasmas 113...242 ng/ml fosinoprilaadi sisalduse (7, 8). Ramipriili ühekordne suukaudne annus 5 mg vastab plasma

4...10 ng/ml ramiprilaadi sisaldusele (9, 10). Pro-oksüdantse koormuse mudelsüsteem tekitati $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kasutamisega inkubatsioonisegus nii, et rava lõppkontsentratsioon oleks 150 μM , 300 μM , 450 μM ja 600 μM .

Erütrotsüütide kromatograafilist migratsiooni (EKM) määrati kromatograafilisel paberil *Filtrak 388*, kasutades meie väljaarendatud mudelsüsteemi, mis põhineb eelnevalt kirjeldatud meetodil (11). Erütrotsüüdid eraldati verest tsentrifuugimisel: 500 pöörat minutis 5 minuti jooksul. Isoleeritud erütrotsüüdid pesti neli korda 0,9% NaCl lahusega. Viimase tsentrifuugimise järel resuspendeeriti erütrotsüüdid füsioloogilises lahuses 60% "hematokritini". Erütrotsüüte inkubeeriti 60 min 37 °C juures ilma pro-oksüdandita (raud) ning pro-oksüdandi erineva kontsentratsiooni juures ilma ravimita (kontroll). Ravimi mõju uurimiseks eelinkubeeriti erütrotsüütide suspensiooni ravimi lahusega 10 min 37°C juures enne 0,1 ml Fe^{2+} lahuse lisamist. Kromatograafilisele paberile horisontaalsel raamil pipeteeriti 0,2 ml füsioloogilist lahust (lahusti) ning 60 sekundi pärast kanti samasse keskpunkti 0,02 ml erütrotsüütide suspensiooni (katse). Mõlema ala (lahusti ja katse) diameetrid (vastavalt dl ja dk) mõõdeti 60 sekundi pärast. EKM (protsentides) arvutati järgmise valemi kohaselt:

$$\text{EKM} = \frac{dk}{dl} \cdot 100\%$$

Andmete statistilisel analüüsil kasutati arvutiprogrammi Microsoft Excel. Erinevust peeti statistiliselt oluliseks $p < 0,05$ korral.

Tulemused

Eelkatsetes leiti, et kasutatud ravimite toimet erütrotsüütide kromatograafiline migratsioon ei muutu. Rava toimet erütrotsüütide deformatsioon väheneb ja seda rava kontsentratsioonist sõltuvalt ning statistiliselt tõenäoliselt. Tabelis 1 on toodud EKM erinevate rauakontsentratsioonide juures. Deformatsiooni vähenemine väljendus erütrotsüütide poolt tekitatud migratsiooniala diameetri vähenemises rava juuresolekul. Ravimite toimet raud-tingitud erütrotsüütide kromatograafilise migratsiooni suhtes

näitavad tabelis 2 toodud andmed. Seal on toodud ravimite kaitsetoime protsentides. Mida suurem on see arv, seda võimsam on ravimi kaitsetoime. Lisagem, et töös kasutatud suuremate rauakontsentratsioonide tõttu on igasugune statistiliselt tõenäoline kaitsetoime deformatsiooni vähema häirimise seisukohalt igati positiivne. Nagu näha tabeli 1 ja 2 andmete kõrvutamisel, kaitseb 5 μM kaptopriil erütrotsüütide membraane Fe^{2+} peroksüdatiivse toime eest täielikult rauakontsentratsioonil 150 μM , kusjuures see kaitsetoime on statistiliselt tõenäoline nagu ka 300 μM ja 450 μM rava puhul. Ramiprilaadi kontsentratsioonid 7,5 ng/ml, 15 ng/ml ja 30 ng/ml kaitsevad samuti Fe^{2+} oksüdatiivse toime eest. Statistiliselt tõenäoline kaitsetoime on kõikidel ravimikontsentratsioonidel 300 μM ja 450 μM Fe^{2+} juures. Tähelepanu väärib see, et kaitsetoime on 30 ng/ml ramiprilaadi lahusel pisut tugevam kui kaptopriili puhul. Lisaks esineb 30 ng/ml ramiprilaadi lahusel teatud kaitsetoime isegi 600 μM Fe^{2+} juures. 125 ng/ml ja 175 ng/ml fosinopriilaadi lahustel on statistiliselt tõenäoline kaitsetoime vaid 600 μM Fe^{2+} juures.

Tabel 1. Rava mõju erütrotsüütide kromatograafilisele migratsioonile (muutused statistiliselt tõenäolised)

Kontroll	150 μM Fe^{2+}	300 μM Fe^{2+}	450 μM Fe^{2+}	600 μM Fe^{2+}
100%	96%	85%	77%	73%

Kontrolliks erütrotsüüdid füsioloogilises lahuses.
Hajuvuspiirid 5–10% näidu väärtusest.

Tabel 2. Kaptopriili (KAP; n = 12), ramiprilaadi (RAM; n = 8) ja fosinopriilaadi (FOS; n = 10) kaitsetoime (protsentides) vastava rauakontsentratsiooni juures

	150 μM Fe^{2+}	300 μM Fe^{2+}	450 μM Fe^{2+}	600 μM Fe^{2+}
5 μM KAP	4*	6*	7*	2
7,5 ng/ml RAM	2	11*	5*	2
15 ng/ml RAM	1	7*	8*	0
30 ng/ml RAM	4	9*	10*	3*
125 ng/ml FOS	1	1	6	8*
175 ng/ml FOS	0	0	3	8*

* $p < 0,05$
Hajuvuspiirid 5–10% näidu väärtusest.

Arutelu

On selge, et ravimid, mis on suutelised ära hoidma vaba raua väga võimsat pro-oksüdantset kahjulikku toimet, omavad ka teatud antioksüdantset toimet ja on seega suurema terapeutilise potentsiaaliga kui ravimid, millel selline efekt puudub või mis hoopis võimendavad raua kahjustavat toimet. Rauaprobleemid on üha enam päevakorral ka seetõttu, et raua kuhjumine organismis on viimasel ajal tõusnud mitme haiguse oluliste patogeneesifaktorite hulka.

Mikrotsirkulatsiooni normaalseks toimimiseks peavad erütrotsüüdid deformeeruma, et läbida kitsaid, endast väiksema diameetriga kapillaare. Erütrotsüüdid on oksüdatiivse kahjustuse suhtes eriti tundlikud tänu suurele polüküllastamata rasvhapete hulgale membraanides, suurele rakusisese hapniku ning hemoglobiini hulgale, mis on kahjustava oksüdatiivse stressi võimalikuks soodustajaks (3). Suhkruhaigetel, hemodialüüsi patsientidel, kroonilistel alkohoolikutel, kardiovaskulaarsete haiguste korral on erütrotsüütide membraanilipiidide tundlikkus peroksüdatsiooni suhtes suurenenud (3). Lisaks on kõrge vererõhu, suhkruhaiguse korral ja müokardiinfarkti järel suurenenud plasma gamma-glutamüültranspeptidaasi (GGT) aktiivsus, kõrge GGT aktiivsusega inimestel on suurenenud erütrotsüütide oksüdatsiooni-tundlikkus ja vähenenud nende deformeeritavus (3). Süvenenud oksüdatiivse stressi korral (see on aga hüpertensioonile väga omane) võib raud oma sidujatest (sh ka hemoglobiinist) vabaneda ning põhjustada erütrotsüütide membraanilipiidide peroksüdatsiooni, mis vähendab erütrotsüütide deformeeritavust (1, 3, 4). AKE inhibeerimine ramipriiliga soodustab hemodünaamika paranemist, suurendab endoteelist sõltuvat vasodilatatsiooni (12) ning parandab perifeerse oblitereeruva ateroskleroosiga patsientide elulemust (13). Veel vähendab ramipriil südamepuudulikkuse tekke kiirust kardiovaskulaarsete tüsistuste suhtes suure riskiga patsientide grupis (14). I tüüpi diabeediga hüperglükeemilistel patsientidel võib ravi väikse ramipriiliannusega parandada mikrotsirkulatsiooni ka enne mikrovaskulaarsete komplikatsioonide ilmnemist (2).

On teada, et normaalne seerumi rauasisaldus on meestel 11–28 μM ja naistel 6,6–26 μM (15). Selles töös valisime suuremad rauakontsentratsioonid kui tavaliselt sissevõetavad preparaadid veres tekitada võiksid, kuid sellised rauakontsentratsioonid võivad organismis lokaalselt tekkida ja seda kindlasti mitmete patoloogiliste sündmuste puhul. On selge, et kui ravim suudab elimineerida suuremast rauakontsentratsioonist tekitatud kahju, siis väiksematel rauakontsentratsioonidel sellega probleeme ei teki. Raua profülaktiline annus on tavaliselt 30 mg, ravidoosina kasutatakse ka 100 mg. Mitteheemsest rauast imendub umbes 5%; seega vastavalt 1,5 mg ja 5 mg, mis annab 5 l veres kontsentratsiooni kasvuks 0,3 mg/l (5,4 μM) ja 1 mg/l (17,9 μM). Kuid veres on ikkagi tegu transferriniiga seotud rauaga, mitte vaba kahevalentse rauaga. Seega ei saa situatsiooni seerumis otseselt oksüdatiivse stressi mudelsüsteemis tekitatud kontsentratsioonidele üle kanda.

Meie tööst selgub, et kaptopriil, ramipriil ja fosinopriil on võimelised juba terapeutilistes kontsentratsioonides vältima rauaioonide poolt põhjustatud erütrotsüütide deformeeritavuse olulist vähenemist. Uuritud ravimite kaitsev toime sõltub Fe^{2+} kontsentratsioonist: väikse rauakontsentratsiooni (150 μM) põhjustatud erütrotsüütide kromatograafilise migratsiooni muutuste eest kaitses hästi kaptopriil. Keskmiste rauakontsentratsioonide (300 μM ja 450 μM) eest kaitses ramipriil ning kõige suurema rauakontsentratsiooni (600 μM) puhul oli teatud kaitsetoime fosinopriilil.

AKE inhibiitorite lipiidide peroksüdatsiooni vastast kaitsetoimet saab seletada metalli kelaatimisega (1, 16, 17), vabade radikaalide püüdmisega (1, 16, 17), nende mittespetsiifilise seostumisega makromolekulide nende aladega, mis on olulised vabade radikaalide genereerimises või vabade radikaalide rünnakus (1). Reaktiivsete hapnikuosakeste (ROS) genereerimine on katalüüsitud muutuva oksüdatsiooniastmega metallide ionide (eeskätt rauaioonide) poolt, aga kui metall kelaatida, siis ei saa ta käituda pro-oksüdandina. On näidatud kaptopriili, enalapriilaadi ja lisinopriili

vaske ja rauda kelaativat toimet ning järeldatud, et SH-grupi olemasolu struktuuris ei pruugi olla seega ROS püüdmise võime aluseks (1, 17). Siiski seostatakse seda tihti just kaptopriili koostises oleva tiolrühmaga: vabad radikaalid ja teised oksüdandid reageerivad esmalt sellega konverteerides SH-rühma tiüülradikaaliks või oksüdeerides kaptopriili disulfiidiks (1, 16). Vask moodustab kaptopriili, enalapriilaadi ja lisinopriiliga komplekse suhtes 1 : 1 (metall : ligand), raud on komplekside metall : ligand tekkes vasest väiksema efektiivsusega (17). Seega ei saa meie töös ilmnenu efekti seletada raua kelaatimisega. AKE inhibiitoritel on kaitsetoime raua pro-oksüdantse toime suhtes, kuid ise nad erütrotsüütide kromatograafilist migratsiooni statistiliselt ei mõjuta. Kuna raud on keskne pro-oksüdant, võib nende AKE inhibiitorite toimet pidada antioksüdantseks toimeks. Saadud tulemused viitavad AKE inhibiitorite positiivsele mõjule, sest nad takistavad erütrotsüütide deformeerumise langust, mis vähendab oluliselt võimalusi mikrotsirkulatsiooni

tõsiseks häirimiseks tugeva kahjustava membraanilipiidide peroksüdatsiooni tingimustes.

Kokkuvõte

AKE inhibiitorid kaptopriil, ramipriil ja fosinopriil (vastavalt ramipriili ja fosinopriili aktiivsed metaboliidid) erütrotsüütide deformatsioonile mõju ei avalda, kuid nad kaitsevad erütrotsüütide membraani pro-oksüdantse raua kahjuliku toime eest. Erinevate AKE inhibiitorite toimemaksimum on raua erinevate kontsentratsioonide juures. See töö annab ühe lisaargumendi AKE inhibiitorite kasutamiseks hüpertensiooni ravis olukorras, kui on tegu oksüdatiivse stressiga.

Tänuavaldused

Täname verekeskuse töötajaid, kes lahkelt olid nõus abistama veenivere kogumisel, Ravimiametit ning firmasid Aventis Pharma (Hoechst AG) ja Bristol-Myers Squibb, kust saime vajalikud ained. Tööd on toetanud Eesti Teadusfond (grant nr 5327).

Kirjandus

1. Fernandes AC, Filipe PM, Freitas JP, Manso CF. Different effects of thiol and nonthiol ACE inhibitors on copper-induced lipid and protein oxidative modification. *Free Radic Biol Med* 1996;4:507–14.
2. Haak E, Haak T, Kusterer K, Reschke B, Faust H, Usadel KH. Microcirculation in hyperglycemic patients with IDDM without diabetic complications-effect of low-dose angiotensin-converting enzyme inhibition. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998;106:45–50.
3. Aberkane H, Stoltz JF, Galteau MM, Wellman M. Erythrocytes as targets for gamma-glutamyltranspeptidase initiated pro-oxidant reaction. *Eur J Haematol* 2002;68:262–71.
4. Comporti M, Signorini C, Buonocore G, Ciccoli L. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radic Biol Med* 2002;32:568–76.
5. Franklin ME, Addison RS, Baker PV, Hooper WD. Improved analytical procedure for measurement of captopril in human plasma by gas chromatography – mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies. *J Chromatogr Biomed Sci Appl* 1998;705:47–54.
6. Creasey WA, Funke PT, McKinstry DN, Sugerman AA. Pharmacokinetics of captopril in elderly healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 1986;26:264–8.
7. Ding PY, Chu KM, Hu OY, Huang GM, Jeng JJ, Chang A. Fosinopril: pharmacokinetics and pharmacodynamics in Chinese subjects. *J Clin Pharmacol* 1999;39:155–60.
8. Blumenthal M. Treatment of congestive heart failure. Experience with fosinopril. *Am J Hypertens* 1997;10(Suppl.):289–98.
9. Verho M, Luck C, Stelter WJ, Rangoonwala B, Bender N. Pharmacokinetics, metabolism and biliary and urinary excretion of oral ramipril in man. *Curr Med Res Opin* 1995;13:264–73.
10. Ruf G, Gera S, Luus HG, Trenk D, de la Rey N, Löffler K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ramipril and piritanide administered alone and in combination. *Eur J Clin Pharmacol* 1994;46:545–50.
11. Vasilyev AP. Estimation of red cell deformability index. *Laboratornoe Delo* 1991;9:44–6.
12. Emanueli C, Salis MB, Stacca T, Pinna A, Gaspa L, Spano A, Madeddu P. Ramipril improves hemodynamic recovery but not microvascular response to ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2002;15:410–5.

13. Ostergren J, Sleight P, Dagenais G, Danisa K, Bosch J, Qilong Y, et al. Impact of ramipril in patients with evidence of clinical or subclinical peripheral arterial disease. *Eur Heart J* 2004;25:17–24.
14. Arnold JM, Yusuf S, Young J, Mathew J, Johnstone D, Avezum A, et al. Prevention of heart failure in patients in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. *Circulation* 2003;107:1284–90.
15. Siigur U, Ora E. Ühendlabori käsiraamat 2002. Tartu: Tartu Ülikooli Kliinikum; 2002.
16. Bartosz M, Kedziora J, Bartosz G. Antioxidant and prooxidant properties of captopril and enalapril. *Tree Rad Biol Med* 1997;23:729–35.
17. Fernandez MT, Silva MM, Mira L, Florencio Mh, Gill A, Jennings KR. Iron and copper complexation by angiotensin-converting enzyme inhibitors. A study by ultraviolet spectroscopy and electrospray mass spectrometry. *J Inorg Biochem* 1998;71:93–8.

Summary

The effect of ACE inhibitors on iron-induced deformability of RBCs

We studied *in vitro* the effects of three ACE inhibitors at therapeutic concentrations on iron-caused alteration of deformability of red blood cells (RBCs). Ramipril and fosinopril act as pro-drugs; their active metabolites are ramiprilat and fosinoprilat. In our study, we used captopril, ramiprilat and fosinoprilat. Chromatographic migration of RBCs (a marker of their deformability) was

measured with and without pre-treatment with captopril, ramiprilat and fosinoprilat. The experiments showed that they all suppressed iron caused alteration of RBCs deformability already at therapeutic concentrations. The efficiency of the substances used was dependent on iron concentration.

kyllivi@ut.ee